

欧州，中近東におけるホロカルボキシラーゼ合成酵素欠損症の遺伝子解析及び蛍光標識 PCR-SSCP法の有効性の検討

著者	李 雪
号	1495
発行年	1998
URL	http://hdl.handle.net/10097/21626

氏 名 (本籍)

リ
李

セツ
雪

学位の種類

博 士 (医 学)

学位記番号

医 博 第 1 4 9 5 号

学位授与年月日

平成 10 年 3 月 25 日

学位授与の条件

学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科専攻

東北大学大学院医学系研究科
(博士課程) 病態科学系専攻

學位論文題目

欧州，中近東におけるホロカルボキシラーゼ合成
酵素欠損症の遺伝子解析及び蛍光標識 PCR-SSCP
法の有効性の検討

(主 查)

論文審査委員

教授 成澤 邦 明 教授 佐々木 毅

教授 飯沼 一 宇

論文内容要旨

ホロカルボキシラーゼ合成酵素 (HCS) は、ビオチンを複数のカルボキシラーゼに取り込ませる反応を触媒する酵素である。HCS 欠損症は新生児期に代謝性アシドーシス、複数のカルボキシラーゼの欠損を反映する有機酸尿、皮膚炎などを起こして発症し、ビオチン依存性を示す常染色体劣性遺伝性疾患である。これまで当教室では日本人における病因遺伝子変異として、高頻度に認められるミスセンス変異と 1 塩基欠失を報告してきた。本研究は人種による HCS 欠損症の病因遺伝子変異の異同の解析及び自動蛍光シーケンサーを用いた蛍光標識 PCR-SSCP 法の有効性の検討を目的として行った。研究対象は欧州～中近東における 7 名の HCS 欠損症患者（症例 A～G）である。

その結果、患者 A には遺伝子多型 S278S (C1121T) とミスセンス変異 V333E (T1285A) が検出された。患者 B には 1 塩基の欠失 (delC2279) が検出された。これによって、フレームシフトが起こり、この下流 41 番目のアミノ酸が停止コドンとなり、全体として正常より約 22 アミノ酸短いタンパク質ができることが予想された。患者 C には遺伝子多型 S278S (C1121T) とミスセンス変異 D571N (G1998A) が検出された。患者 D には 1 塩基の欠失 (delT1876) 及び塩基配列 1740 番目から 1807 番目までの 68 塩基の欠失 (del1740～1807) が検出された。delT1876 によって、フレームシフトが起こり、この下流 15 番目のアミノ酸が停止コドンとなり、全体として正常より約 4 分の 1 ほど短いタンパク質ができることが予想された。del1740～1807 はエキソンスキップによるものと考えられた。患者 E にはミスセンス変異 T462I (C1672T) が検出された。患者 F には遺伝子多型 S278S (C1121T) とミスセンス変異 G581S (G2028A) が検出された。患者 G には 2114, 2115, 2116 の TAC3 塩基欠失 (delThr610) が検出された。患者 A, B, C, D, E はヘテロ接合体で、患者 F, G はホモ接合体であることを PCR-制限酵素法及び対立遺伝子特異的 PCR 法で判明した。

また、各々の遺伝子変異を導入した HCS タンパク質を発現させ、活性を確認したところ、いずれも野性型に比して低下が見られ、病因変異と確認された。

日本人に高頻度に見い出された L237P 及び delG1067 の遺伝子変異は欧州～中近東の患者では確認されず、人種による HCS 欠損症における変異部位の相違が認められた。

蛍光標識 PCR-SSCP 法の有効性について、前述の 7 名の患者について、HCS cDNA 全長を 12 個のフラグメントに分けて、SSCP を行った。その結果、グリセロール無添加の非変性アクリルアミドゲルで 11 個のフラグメントが異常パターンを表わし、うち 8 個のフラグメントに塩基置換の存在が認められた。真陽性率 (True positive rate) は 72.3% であり、特異性 (True

negative rate) は 96.1% であった。5% グリセロール含有の非変性アクリルアミドゲルの真陽性率は 45.5%，特異性は 94.9% あった。10% グリセロール含有の非変性アクリルアミドゲルで一部分のフラグメントしか PCR-SSCP を行わなかったが，上述の 2 通りのゲルで検出されなかった 1 つ変異に対応するフラグメントに異常パターンを検出され，真陽性率を 81.8% にまで上げることができる。また，泳動中の蛍光シグナルの検出はすべて自動化されておるため，蛍光標識 PCR-SSCP 法は遺伝子変異のスクリーニング法として，有用であると考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

ホロカルボキシラーゼ合成酵素 (HCS) はビオチンを複数のカルボキシラーゼに取り込ませる反応を触媒する酵素である。当教室で、HCS 欠損症の責任遺伝子であるヒト HCS cDNA をクローニングしてから、日本および北米で患者の遺伝子解析がすすめられ、これまで 8 種類の変異 (1 変異は日本と北米で共通) が同定されている。

本研究では人種による病因遺伝子変異の異同を明らかにする目的で、欧州および中近東に在住の 7 例の HCS 欠損患者について遺伝子解析を行った。更に今後の患者解析を容易にするために自動蛍光シーケンサーを用いた蛍光標識 PCR-SSCP 法の有効性を検討した。

欧州および中近東に在住する 7 例の患者の遺伝子解析では 8 種類の変異が同定された。この内訳はミスセンス変異 4 種類 (V333E, T462I, D571N, G581S), 1 塩基欠失 2 種類 (delT1876, delC2279), 3 塩基欠失 1 種類 (delThr610), エクソンスキッピング 1 種類である。D571N 変異はすでに北米で同定された変異であったが、それ以外の 7 種類の変異は全く新しい変異であった。即ち、欧州～中近東における変異は殆どが日本や北米とは異なった変異であり、人種による変異の相違が認められた。欠失変異は蛋白質の構造異常を来すことから病因変異と推定され、ミスセンス変異はすべて発現実験から病因変異であることが証明された。

蛍光標識 PCR-SSCP 法の有効性について、前述の 7 名の患者で検討したところ、グリセロール無添加の非変性アクリルアミドゲルでは真陽性率は 72.3% であり、特異性は 96.1% であった。10% グリセロール含有非変性アクリルアミドゲルでの解析を加えると真陽性率を 81.8% まで上げることが出来、遺伝子変異のスクリーニング法として蛍光標識 PCR-SSCP 法が有用であることを明らかにした。

以上に見る如く、本研究は HCS 欠損症の 7 種類の新しい病因変異を同定したばかりでなく、変異が人種によって異なることを明らかにし、更に今後の患者遺伝子解析を容易にする PCR-SSCP 法を開発するなど先端的な研究であり、学位に相当するものと評価される。